

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

A6

(11)Publication number : 10-243996

(43)Date of publication of application : 14.09.1998

(51)Int.Cl.

A61L 27/00

(21)Application number : 09-052889

(71)Applicant : KAGAKU GIJUTSU SHINKO JIGYODAN

(22)Date of filing : 07.03.1997

(72)Inventor : MATSUDA NAOKI  
YOKOYAMA KANEHISA  
WATANABE MASAMI

## (54) VITAL MATERIAL FOR PROMOTING HARD TISSUE CALCIFICATION

## (57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To promote calcification and to expedite healing at the time of surgically treating the damaged bones, teeth, etc., by using a calcium phosphate compd. and osseous cell aggregate as essential components.

SOLUTION: The osseous cell aggregate is easily formed by inoculating the cells on a general Petri dish for tissue culture coated with a hydrophilic polymer, such as polyhydroxy methyl methacrylate on its surface and culturing the cells for 24 hours. At this time, a calcium phosphate compd. suspension is made to co-exist, by which the formation of the aggregate mixture of the osseous cells and the calcium phosphate compd. is made possible. For example, 103 to 105 of the cells/ml and 1 to 25µg/ml calcium phosphate compd. are adequate as the sizes that provide high activity and to allow the easy visual discrimination of the aggregate. The aggregate may further contain collagen as well. In the case of the osseous cells, the cell function is maintained for a longer period and the cell fixability after the application to the lesion is improved by the presence of the collagen in the cell aggregate.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-243996

(43) 公開日 平成10年(1998) 9月14日

(51) Int.Cl.<sup>8</sup>

識別記号

F I

A 6 1 L 27/00

A 6 1 L 27/00

F

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願平9-52889

(22) 出願日 平成9年(1997) 3月7日

(71) 出願人 396020800

科学技術振興事業団

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(72) 発明者 松田 尚樹

長崎県大村市久原2丁目923-4

(72) 発明者 横山 兼久

長崎県大村市池田2丁目283-1-C-101

(72) 発明者 渡邊 正己

長崎県西彼杵郡三和町晴海台24-15

(74) 代理人 弁理士 田中 宏

(54) 【発明の名称】 硬組織石灰化促進用生体材料

(57) 【要約】

【課題】 損傷した骨、歯などの硬組織を外科的に治療する際に、組織の石灰化を促し、治癒を早めるために用いる硬組織石灰化促進用生体材料を提供することを目的とする。

【解決手段】 リン酸カルシウム系化合物と骨性細胞凝集体を主成分とすることを特徴とする硬組織石灰化促進用生体材料である。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 リン酸カルシウム系化合物と骨性細胞凝集体を主成分とすることを特徴とする硬組織石灰化促進用生体材料。

【請求項2】 細胞凝集体中にリン酸カルシウム系化合物を包含することを特徴とする請求項1記載の硬組織石灰化促進用生体材料。

【請求項3】 細胞凝集体中にコラーゲンを含有することを特徴とする請求項1および2記載の硬組織石灰化促進用生体材料。

【請求項4】 骨性細胞として骨髄間質細胞、骨芽細胞、軟骨芽細胞、歯髄細胞の中から少なくとも1つを選択することを特徴とする請求項1、2および3記載の硬組織石灰化促進用生体材料。

【請求項5】 リン酸カルシウムとしてハイドロキシアパタイト、リン酸3カルシウム、リン酸4カルシウムの中から少なくとも1つを選択することを特徴とする請求項1、2、3および4記載の硬組織石灰化促進用生体材料。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、損傷した骨、歯などの硬組織を外科的に治療する際に、組織の石灰化を促し、治癒を早めるために用いる硬組織石灰化促進用生体材料に関する。

【0002】

【従来技術】骨組織が骨折などの損傷を受けると、骨を作る細胞である骨芽細胞が増殖、分化し、骨が再生する。損傷の軽度な症例においては、患部を固定することによって骨芽細胞が機能し、治癒に至る。複雑骨折や関節内の損傷、さらに骨髄炎の併発などにより骨芽細胞が有効に機能し得ない環境においては、自家骨移植や、人工関節、人工骨のインプラント、骨充填剤の使用などさまざまな外科的処置が施されてきた。しかしながら、これら外科的処置は予後は必ずしも良好ではなく、複数回の手術が必要となることが多い。また骨芽細胞の機能を促進する目的で、bone inorphogenic protein (BMP) などのポリペプチドや、その遺伝子を導入したプラスミドを患部に直接適用するなどの方法も提案されているが、臨床的にはまだ応用されていない。

【0003】口腔組織においては、人工歯根装着前の顎骨形成、歯周病における歯槽骨の石灰化、再生のいずれもが骨性細胞の活性化により達成される。それを積極的に促進する方法としては誘導組織再生法が紹介されているが、臨床的にはまだ普及していない。また術者の技量にも依存するがその成功率は平均して50%程度であり、ほとんどの症例において再生膜を摘出する再手術も必要となる。さらに虫歯において欠損する象牙質は歯髄中に含まれる象牙芽細胞が石灰化し、再生されることが

知らされているが、この細胞の機能を促進する手法は確立していない。そのため虫歯の治療法は病巣部を除去・消毒したのち、歯髄処置を施し生体に対する刺激を消失させ、ついで実質欠損の修復処置を行なうのみである。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】以上述べた硬組織再生の共通点は、骨性細胞の活性化により組織の石灰化を促進すれば治癒が達成されるという理論的裏付けがあるにもかかわらず、それを有効に示し得ていないという事実である。そこで骨性細胞を活性化する方法の一つとし

て、自己の細胞を体外で大量に培養し、それを活性化して患部に戻すという方法が魅力的である。事実、この発想は癌治療におけるLAK療法や遺伝子治療の手法として現実化されている。これらの場合では活性化した免疫細胞を用いるため、全身を循環するよう細胞を骨髄に導入すれば患部にも到達することが予想されるが、骨性細胞の場合には組織損傷部位に培養細胞を直接適用する必要がある。しかしながら、培養細胞は通常倍溶液中の浮遊液もしくはペレットの形態で回収されるため、その患部への適用が困難であり、また適用後も細胞の拡散を防ぐ手段がないため、細胞の定着と活性発現を期待することはできなかった。また、従来より肝細胞などの機能性細胞では、生体内環境に近い凝集体として3次元培養することにより、生体外でも長期にわたり機能発現が続くことが知られているが、骨性細胞の場合には、凝集体を作るよりもむしろシャーレ底面などに付着させて2次元的に培養した方が高い活性が得られることが知られていた。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、かかる事情に鑑み、骨性細胞の機能をよく保持したまま患部に容易に適用することが可能で、しかも適用後の細胞の定着率も高く、石灰化を促進する手法についての研究を行なった結果、骨性細胞の生体内環境である硬組織の無機質の大部分を占めるリン酸カルシウム系化合物と骨性細胞凝集体を共存させるか、あるいは骨性細胞とリン酸カルシウム系化合物の混合凝集体として培養すると、細胞の機能がよく保持され、成形性に優れるため患部への適用が容易であり、さらに組織への定着性も良好であるとの知見を得、その結果、骨性細胞凝集体とリン酸カルシウム系化合物とを主成分とする生体材料を硬組織石灰化促進材料として使用することによって有効であることを見出した。即ち、本願発明の要旨は、リン酸カルシウム系化合物と骨性細胞凝集体を主成分とすることを特徴とする硬組織石灰化促進用生体材料であり、細胞凝集体中にリン酸カルシウム系化合物を包含することを特徴とする硬組織石灰化促進用生体材料である。

【0006】

【発明の実施の態様】本発明について詳細に説明する。本発明における骨性細胞凝集体は、表面をポリヒドロキ

シエチルメタクリレートなどの親水性ポリマーでコートした一般の組織培養用シャーレに細胞を播種し、24時間培養することにより容易に作製される。この際リン酸カルシウム系化合物懸濁液を共存させることにより、骨性細胞とリン酸カルシウム系化合物の混合凝集体を作製することができる。播種する細胞数およびリン酸カルシウム系化合物の濃度により異なるサイズの凝集体を作成することができるが、活性が高く、しかも凝集体を目視で容易に判別できるサイズとして、細胞数 $10^3 \sim 10^4$ 個/ $\text{ml}$ 、リン酸カルシウム系化合物 $1 \sim 25 \mu\text{g}/\text{ml}$ が適当である。この凝集体は、さらにコラーゲンを含むこともできる。多くの細胞の機能は細胞外マトリックスの糖タンパクであるコラーゲンにより変化を受けるが、特に骨性細胞の場合、コラーゲンは硬組織を形成する有機質の大部分を占めるため、細胞凝集体にコラーゲンが存在することにより細胞機能はより長期にわたって維持され、また患部適用後の細胞定着性も向上する。コラーゲンの中ではI型コラーゲンが特に有効であり、細胞播種時に最終濃度 $1 \sim 50 \mu\text{g}/\text{ml}$ のコラーゲンを共存させることにより、取扱いが容易な粘度のコラーゲン含有細胞凝集体を作製することができる。

【0007】細胞としては、培養できるすべての種類の骨性細胞、すなわち骨髄間質細胞、骨芽細胞、軟骨芽細胞、歯根膜細胞、歯髓細胞を用いることができる。このうち通常の骨組織の石灰化には骨髄間質細胞、骨芽細胞、軟骨芽細胞が、歯槽骨の石灰化には歯根膜細胞が、また歯の象牙質の石灰化には歯髓細胞が適当である。骨髄間質細胞は骨髄液中より分離培養が可能であり、その他の細胞は、摘出した組織片をコラゲナーゼを用いた酵素消化法により、もしくはシャーレに付着させた組織片からの細胞遊出法により分離培養する。継代培養を1度行なった後の2次培養以降で、患部に戻す全細胞数として必要である $10^3$ 個程度が確保されれば、随時細胞を凝集体作製に用いることが可能である。また余剰の細胞を凍結して液体窒素中に保存して細胞バンクとし、必要時に解凍して凝集体を作成させることもできる。

【0008】リン酸カルシウム系化合物の代表として用いられるハイドロキシアパタイトは、 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ で示される塩基性のリン酸カルシウム塩であり、 $\text{Ca}/\text{PO}_4$ モル比が $1.67$ となるような湿式法、乾式法、水熱法のいずれかを用いて合成する。凝集体にはその圧粉体を用いるが、その平均粒子径は $5 \sim 15 \mu\text{m}$ が好ましい。試薬として安価に市販されているものでもよく、また多孔質アパタイト、顆粒状アパタイトを用いてもよい。また水和凝結硬化性を有するリン酸カ

ルシウム系化合物として、 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ で示されるリン酸3カルシウム、および $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_3$ で示されるリン酸4カルシウムを用いることもでき、これら化合物ではそれぞれ $\text{Ca}/\text{PO}_4$ モル比が $1.50$ または $2.00$ となるように湿式法または乾式法で合成する。リン酸3カルシウムは歯科用に販売されているものを用いてもよい。これらの化合物は中性領域の水溶液中で凝結によりアパタイトへ転化することから、より生体親和性の高い凝集体を作成することができる。以上のリン酸カルシウム系化合物にはそれぞれ単独で骨充填剤や歯科用セメントとして臨床応用されたものもあるが、細胞との混合凝集体を作成し、骨性細胞の機能促進を介して石灰化に応用した例は見られない。またリン酸カルシウム系化合物単体に比して細胞との混合凝集体が遥かに高い有効性を示す。

【0009】かくして作成した骨性細胞凝集体は、医薬上許される担体、例えば水溶液として生理食塩水、ゲル化剤としてメチルセルロース/グリセリンなどと合して用時製剤化する。骨損傷部位に対してはハイドロキシアパタイト系骨充填剤による処置と同様の施術で、また虫歯の治療には露髄面に直接投与することにより使用できる。通常、該細胞凝集体を $10^3 \sim 10^4$ 個、細胞数にして約 $10^3$ 個を患部に投与すると、所望の石灰化促進効果が発揮される。

【0010】

【実施例及び比較例】先ず、本発明にかかる凝集体における細胞の生存性、石灰化能、遊出および定着力を調べた。

実験1 膜性骨由来骨芽細胞、歯根膜細胞、歯髓細胞の生存性に対する作用

整形外科手術により摘出されたヒト膜性骨より骨芽細胞を、またヒト抜去歯に残存する歯根膜および歯髓より歯根膜細胞、歯髓細胞を単離、培養し、コンフルエントな単層培養を行った場合と、これと同数の細胞を用いて細胞凝集体、および種々の混合凝集体を形成した場合における、これらの細胞の生存性を比較した。細胞の生存性は、テトラゾリウム塩(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide;MTT)が、細胞内ミトコンドリアの脱水素酵素により分解され、生じるホルマザンを $570 \text{nm}$ の吸光度で測定する方法(MTT法)により調べた。結果を表1に示した。

【0011】

【表1】

(4)

特開平10-243998

5 細胞	培養形態	培養日数	6 吸光度 (570nm)
骨芽細胞初代細胞	単層培養	1	1.268
		2	1.356
		5	1.411
		10	1.238
		1	1.110
	細胞凝集体	2	0.820
		5	0.210
		10	0.109
		1	1.197
		2	1.089
	細胞とハイドロキシアパタイト (10 $\mu$ g) の混合凝集体	5	1.002
		10	1.191
		1	1.274
		2	1.588
		5	1.632
	細胞とハイドロキシアパタイト (10 $\mu$ g) およびコラーゲン (10 $\mu$ g) の 混合凝集体	10	1.520
歯髓細胞 (2次培養細胞)	単層培養	1	1.333
		2	1.298
		5	1.402
		10	1.352
		1	0.901
	細胞凝集体	2	0.633
		5	0.587
		10	0.095
		1	1.216
		2	1.001
	細胞とハイドロキシアパタイト (20 $\mu$ g) の混合凝集体	5	1.137
		10	1.167
		1	1.233
		2	1.642
		5	1.698
	細胞とハイドロキシアパタイト (20 $\mu$ g) およびコラーゲン (10 $\mu$ g) の 混合凝集体	10	1.602
歯髓細胞 (凍結解凍後 2次培養細胞)	単層培養	1	0.842
		2	0.796
		5	0.839
		10	0.798
		1	0.322
	細胞凝集体	2	0.147
		5	0.059
		1	0.750
		2	0.711
		5	0.715
	細胞と $\alpha$ TCP (20 $\mu$ g) の混合凝集体	10	0.598
		1	0.985
		2	0.902
		5	0.925
		10	0.899

【0012】以上の結果から明らかなごとく、骨性細胞とリン酸カルシウム系化合物の混合凝集体は、単層培養細胞と同等の生存性を維持する。コラーゲンを含有することにより、骨性細胞とリン酸カルシウム系化合物の混合凝集体は、単層培養細胞よりもさらに高い生存性を維持している。

【0013】実験2 腭性骨由来骨芽細胞、歯根膜細胞、歯髓細胞の石灰化能に対する作用

実験1と同様に単離、培養された骨芽細胞、歯根膜細胞、歯髓細胞が石灰化して硬組織を形成する能力を示す指標として、細胞のアルカリ性フォスファターゼ (ALP) 活性に着目し、コンフルエントな単層培養、これと同数の細胞を用いた細胞凝集体、および種々の混合凝集体を超音波で破砕し、細胞内のALP活性をp-ニトロフェニルアラニを基質として測定した結果を表2に示した。

[0014]

細胞	培養形態	* * [表2]	
		培養日数	ALP活性(U/mg protein)
骨芽細胞初代細胞	単層培養	1	252
		2	350
		5	539
		10	567
		1	233
	細胞凝集体	2	201
		5	188
		10	121
		1	290
		2	402
細胞とMT-047H タンパク質 (15 $\mu$ g) の混合凝集体	細胞とMT-047H タンパク質 (15 $\mu$ g)	5	639
		10	659
		1	286
		2	370
		5	654
	およびコラーゲン (15 $\mu$ g) の混合凝集体	10	642
		1	79
		2	84
		5	106
		10	347
歯根膜細胞 (2次培養細胞)	細胞凝集体	1	60
		2	25
		1	69
		2	86
		5	226
	細胞と4CP (20 $\mu$ g) の混合凝集体	10	468
		1	81
		2	119
		5	254
		10	480
歯髓細胞 (凍結解凍後 2次培養細胞)	単層培養	1	126
		2	139
		5	180
		10	202
	細胞凝集体	1	107
		2	66
		5	39
		1	108
		2	141
細胞と $\alpha$ TCP (10 $\mu$ g) の混合凝集体	細胞と $\alpha$ TCP (10 $\mu$ g)	5	198
		10	305
		1	118
		2	157
		5	290
	およびコラーゲン (10 $\mu$ g) の混合凝集体	10	412

【0015】以上の結果から明らかなごとく、骨性細胞とリン酸カルシウム系化合物の混合凝集体は、単層培養細胞よりもさらに高い石灰化能を維持する。コラーゲンを含有することにより、骨性細胞とリン酸カルシウム系化合物の混合凝集体の石灰化能はさらに向上する。

【0016】実験3 凝集体からの細胞の遊出および定着性

実験1、2と同様に培養された骨芽細胞、歯根膜細胞、

歯髓細胞の細胞凝集体、および種々の混合凝集体（培養2日後）を組織培養用シャーレに移し7日間単層培養を行なった後、凝集体を除去した。凝集体から遊出し、シャーレ表面に定着していた細胞をトリプシンで回収し、トリパンブルーで染色後、生細胞数を計測した結果を表3に示した。

【0017】

【表3】

9 細胞	培養形態	10 細胞数 ( $\times 10^4$ )
骨芽細胞	細胞凝集体	1.02
	細胞とハイドロキシアパタイト (15 $\mu$ g) の混合凝集体	2.58
	細胞とハイドロキシアパタイト (15 $\mu$ g) およびコラーゲン (15 $\mu$ g) の混合凝集体	3.23
	細胞凝集体	1.36
歯根膜細胞	細胞と4CP (20 $\mu$ g) の混合凝集体	2.90
	細胞と4CP (20 $\mu$ g) および コラーゲン (10 $\mu$ g) の混合凝集体	3.39
	細胞凝集体	1.24
歯髓細胞	細胞と $\alpha$ TCP (10 $\mu$ g) の混合凝集体	2.74
	細胞と $\alpha$ TCP (10 $\mu$ g) および コラーゲン (10 $\mu$ g) の混合凝集体	3.69
	細胞凝集体	1.24

【0018】以上の結果から明らかなごとく、リン酸カルシウム系化合物との混合凝集体の細胞は、細胞のみの凝集体中の細胞よりも多く遊出し、定着した。混合凝集体中にコラーゲンを含有することにより細胞の遊出および\*

\*び定着性はさらに向上した。

【0019】次に実施例をもって、更に本発明を詳細に説明する。

#### 実施例1

成分	量
膜性骨由来骨芽細胞 ( $2 \times 10^4$ 個/ml)	100 $\mu$ l
(培養液: アルファMEM培地+20%牛胎児血清)	
ハイドロキシアパタイト (200 $\mu$ g/ml)	100 $\mu$ l
(アルファMEM培地中の懸濁液として)	

上記の組成よりなる細胞含有ハイドロキシアパタイト懸濁液を作製し、これをポリヒドロキシエチルメタクリレートでコートした組織培養用96穴マルチプレートに1穴あたり100  $\mu$ lずつ播種し、37度で24時間、CO<sub>2</sub>インキュベーター内で培養後、ハイドロキシアパタイト懸濁液を加え、20  $\mu$ gのハイドロキシアパタイト※

※と10<sup>4</sup>個細胞凝集体の混和物を得た。この混和物を減菌スピッツに移し低速(1000rpm程度)で5分間遠心して集め、さらに生理食塩水で2度洗い、これを実験例4及び5の記載方法に従って患部に適用した。

【0020】

#### 実施例2

成分	量
膜性骨由来骨芽細胞 ( $2 \times 10^4$ 個/ml)	100 $\mu$ l
(培養液: アルファMEM培地+20%牛胎児血清)	
ハイドロキシアパタイト (200 $\mu$ g/ml)	100 $\mu$ l
(アルファMEM培地中の懸濁液として)	

上記の組成よりなる細胞含有ハイドロキシアパタイト懸濁液をポリヒドロキシエチルメタクリレートでコートした組織培養用96穴マルチプレートに1穴あたり100  $\mu$ lずつ播種し、37度で24時間、CO<sub>2</sub>インキュベーター内で培養し、20  $\mu$ gのハイドロキシアパタイトと10<sup>4</sup>個細胞の混合凝集体を得た。得られた混合凝集体を実験例1と同様にして患部に適用した。

【0021】

#### 実施例3

成分	量
歯根膜細胞 ( $2 \times 10^4$ 個/ml)	100 $\mu$ l
(培養液: ダルベッコMEM培地+20%牛胎児血清)	
3リン酸カルシウム (200 $\mu$ g/ml)	50 $\mu$ l
(ダルベッコMEM培地中の懸濁液として)	
I型コラーゲン中性溶液 (200 $\mu$ g/ml)	50 $\mu$ l
(ダルベッコMEM培地中の懸濁液として)	

上記の組成よりなる細胞、ハイドロキシアパタイト懸濁液およびI型コラーゲン中性溶液を、ポリヒドロキシエ

チルメタクリレートでコートした組織培養用96穴マルチプレートに1穴あたり上記の量ずつ播種し、37度で24時間、CO<sub>2</sub>インキュベーター内で培養し、20μgのハイドロキシアパタイト、10μgのI型コラーゲン、および10<sup>4</sup>個細胞の混合凝集体を得た。得られた混合凝集体を実施例1と同様にして患部に適用した。

【0022】実施例1〜3によって得られた凝集体を実験4及び5にしたがって患部に適用した。

実験4 イヌ口腔硬組織(歯槽骨およびセメント質)の新生作用

イヌ下顎第3および第4前臼歯の粘膜骨膜弁を剥離したのち、根分枝部骨欠損を作成した。さらに歯頸部を結紮し歯垢の沈着をうながすリガチャー法により実験的歯周\*

1: 歯槽骨再生率(%) =

$$\frac{\text{近遠心ノッチの中心点から新生歯槽骨の最歯冠側端までの距離}}{\text{近遠心ノッチの中心点から分枝部円蓋の最歯冠側端までの距離}} \times 100$$

【0024】

※ ※【数2】

2: セメント質再生率(%) =

$$\frac{\text{近心・遠心ノッチから近心・遠心新生セメント質上端部までの距離の和}}{\text{近心・遠心ノッチから分枝部円蓋の最歯冠側端までの距離の和}} \times 100$$

【0025】

★ ★【表4】

検体	歯槽骨再生率	セメント質再生率
無処置	4.5±0.1	9.5±2.4
細胞凝集体	6.8±1.4	10.2±2.2
細胞とハイドロキシアパタイト(10μg)の混合凝集体	31.5±5.9	59.7±7.7
細胞とハイドロキシアパタイト(10μg)およびコラーゲン(10μg)の混合凝集体	58.8±12.2	87.3±11.9
誘導組織再生法	42.3±21.2	49.8±13.6
細胞とハイドロキシアパタイト(10μg)の混合凝集体と誘導組織再生法の併用	88.1±23.3	85.5±17.4
細胞とハイドロキシアパタイト(10μg)およびコラーゲン(10μg)の混合凝集体と誘導組織再生法の併用	92.3±10.4	90.0±10.2

【0026】以上の結果から明らかなごとく、歯根膜細胞とリン酸カルシウム系化合物の混合凝集体よりなる石灰化促進剤は、歯槽骨およびセメント質の新生を顕著に促進する。この作用は凝集体中にコラーゲンを含有することにより増強され、歯槽骨に関しては従来の誘導組織再生法と併用することによりその効果はさらに向上した。

【0027】実験5 イヌ露髄面に投与した場合の象牙質新生作用

イヌ臼歯の、咬合面より根尖に向かってターピンを用い

\* 炎を惹起させた。1週間後、歯肉弁を剥離、歯根表面の清掃を行ない、後の病理組織学的定量化に用いるため骨欠損底部に相当する近遠心歯根面にノッチと呼ばれる基準点を付加した。実施例に示された歯根膜由来細胞とリン酸カルシウム系化合物の混合凝集体を、分枝部骨欠損領域を充填させるように埋め込み、動物によってはさらにその頬、舌側を誘導組織再生法用テフロン膜で覆い、縫合した。評価は術後3カ月後に被験部位を採取し、常法により組織標本を作成した後、顕微鏡下で接眼マイクロメーターを用いて各部位間の距離を測定し、以下の式により算出し、その結果を表4に示した。

【0023】

【数1】

40 て機械的に窩洞を形成して歯髄面を露呈させ、洗浄、消毒後、実施例に示された歯髄細胞とリン酸カルシウム系化合物の混合凝集体10<sup>4</sup>個を露髄面に投与し、リン酸亜鉛セメントにより裏層した。対象としては従来覆髄剤として用いられている水酸化カルシウムペーストを用いた。4週間後、被験歯を抜去し、分割後、垂直面を撮影し、新生した象牙質の面積を画像解析装置により測定した。結果を表5に示した。

【0028】

【表5】



13  
検体

14  
新生象牙質面積(mm<sup>2</sup>)

水酸化カルシウムペースト	0.18 +/- 0.10
細胞凝集体	0.22 +/- 0.15
細胞と $\alpha$ TCP (10 $\mu$ g) の混合凝集体	2.51 +/- 0.32
細胞と $\alpha$ TCP (10 $\mu$ g) および コラーゲン (10 $\mu$ g) の混合凝集体	3.28 +/- 0.48

【0029】以上の結果から明らかなごとく、歯髄細胞とリン酸カルシウム系化合物の混合凝集体よりなる石灰化促進剤は、象牙質の新生を顕著に促進する。この作用は凝集体中にコラーゲンを含有することによりさらに増強された。

【0030】

【発明の効果】本発明によれば、硬組織を外科的に治療する際に有用な、骨および象牙質石灰化作用を有する生体材料が得られる。